

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02883

研究課題名（和文）脳における体細胞モザイクに着目した脳形成異常の分子病態解明

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of brain malformations in de novo postzygotic mutations in the brain

研究代表者

伊東 恭子（Itoh, Kyoko）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任教授

研究者番号：80243301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：体細胞遺伝子バリエーションのモザイク、特にPI3K-AKT-MTOR経路のシグナルかく乱を背景とする脳形成異常の分子メカニズムを検討した。マウス胎仔脳に子宮内電気穿孔法によりAKT1バリエーション（AKT1E17K）を導入した細胞では、PI3K-AKT-mTORシグナルの過剰な活性化、中間帯での遊走抑制、多極性細胞形態、細胞サイズの増大、複数の皮質層マーカー転写因子群の異所性発現を示した。Photo Isolation Chemistry (PIC) 法を用いた空間トランスクリプトーム解析で、AKT1バリエーションによる遊走異常にはアクチン細胞骨格の再構築を制御するシグナル経路が関係している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体細胞遺伝子バリエーションのモザイクで発生する脳形成異常に関して、神経病理学的解析を基盤に置きつつ、分子病態メカニズムの解明を進めた。マウス胎仔脳への子宮内電気穿孔法を用いたバリエーション遺伝子導入による分子形態学的解析は、ヒト脳形成異常を再現する有効なin vivoモデルとなった。Photo Isolation Chemistry法を用いた空間トランスクリプトーム解析で、当該モデルにおける遊走異常にアクチン細胞骨格の再構築を制御するシグナル経路が関係している可能性が示された。本研究は、大脳形成異常の分子メカニズムの一端を明らかにし、分子レベルでの治療法を探索する礎となった点で社会的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：It is known that somatic activation of PI3K-AKT-MTOR signaling causes malformations of cortical development ranging from hemimegalencephaly to focal cortical dysplasia. In order to elucidate the underlying pathomechanisms, we generated mouse model of somatic mosaicism using in utero electroporation of mutated AKT1E17K in fetal brains. Mutated AKT1-transfected cells showed abnormal migration associated with aberrant expression of cortical layer-specific transcription factors such as Ctip2 and Satb2 and enlarged multipolar cells in the intermediate zone of the fetal cortex. Spatial transcriptomics by Photo Isolation Chemistry revealed that migration disorders might be induced by aberrant reconstruction of actin filaments in the AKT1-mutated cells. We recapitulated the characteristics of the human brain malformation with mutated AKT1. Further analyses could shed light on the mechanisms involved in disrupted brain development in the somatic mosaicism of the PI3K-AKT-MTOR pathway.

研究分野：胎児医学

キーワード：脳形成異常 体細胞モザイク 子宮内電気穿孔法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 研究開始当初の背景生殖細胞系列ではなく体細胞遺伝子変異のモザイクによる脳形成異常の症例が近年集積されてきた。
- (2) 体細胞遺伝子バリエーションのモザイク、特にPI3K-AKT-MTOR経路のシグナルかく乱を背景とする症例では、片側巨脳症などの脳形成異常を惹起するが、その細胞分子メカニズムは不明である。
- (3) PI3K-AKT-MTOR経路に関連した遺伝子群を標的遺伝子とし、マウス胎仔脳を用いて子宮内電気穿孔法により体細胞遺伝子バリエーションモザイクを作製し、脳形成異常の分子病態メカニズム解明を進め、創薬スクリーニングを含めた治療戦略の探索に挑むことを企図する。

2. 研究の目的

- (1) PI3K-AKT-MTOR経路のシグナルかく乱を惹起する体細胞遺伝子バリエーションのモザイクでみられる脳形成異常分子病態メカニズムを明らかにする。
- (2) マウス胎仔脳に子宮内電気穿孔法により標的遺伝子の導入を行い、その後の神経幹・前駆細胞 (NSPCs) の増生、神経細胞の分化・移動と定着、軸索、樹状突起の発達、神経回路の形成過程を動的に解析する。
- (3) バリエーション遺伝子を導入した細胞、背景の非導入細胞で、個細胞レベルにおける網羅的なトランスクリプトーム解析を行ない、分子病態を解明するとともに、胎児期分子標的医療のための創薬スクリーニングに資する。
- (4) ヒトNSPCsを用いたin vitroの系で、標的遺伝子のモザイク脳オルガノイドを作製し、個細胞レベルにおけるエピゲノム・分子発現変動から細胞系譜・分化動態を解明するとともに、胎児期分子標的医療のための創薬スクリーニングを目指した探索的研究を行う。

3. 研究の方法

- (1) pmCherry-N1ベクターを骨格として、プロモーターをpCMVからpCAGに変更、HA-tag、かつ細胞膜移行シグナルCaaXを入れたベクターに、AKT1 WT、AKT1 E17K、PIK3CA WT、3CA E545Kを挿入し、WTと変異遺伝子のベクターを作製した。

Empty: pCAG-HA tag-P2A-mCherry、pCAG-HA tag-P2A-mCherry-CaaX

pCAG-AKT1-HAtag-P2A-mCherry、pCAG-AKT1-HAtag-P2A-mCherry-CaaX

pCAG-AKT1E17K-HAtag-P2A-mCherry、pCAG-AKT1 E17K-HAtag-P2A-mCherry-CaaX

pCAG-PIK3CA-HAtag-P2A-mCherry、pCAG-PIK3CA-HAtag-P2A-mCherry-CaaX、

pCAG-PIK3CAE545K-HAtag-P2A-mCherry、pCAG-PIK3CAE545K-HAtag-P2A-mCherry-CaaX

- (2) *in vivo* での動的解析

胎齢13.5日に子宮内電気穿孔法により、上記プラスミドのうち、AKT1バリエーション、AKT1WT、またはemptyベクターを胎仔脳脳室帯神経幹・前駆細胞に導入後、胎齢15.5日、16.5日、17.7日、生後3日に脳の組織切片を作製、免疫染色等を駆使し、神経幹・前駆細胞 (NSPCs) の増生、神経細胞の分化・移動と定着などを解析した。

空間的遺伝子発現解析：胎齢13.5日のマウス胎仔脳側脳室脳室帯に子宮内電気穿孔法でAKT1バリエーションまたはemptyベクターを導入後、胎齢15.5日の胎仔脳の間脳帯に移動した導入細胞を対象にPIC法 (Photo-Isolation-Chemistry) を用いて空間的遺伝子発現解析を行った (受託解析)。

4. 研究成果

- (1) 変異遺伝子 (AKT1E17K) 導入細胞では、AKTWT、emptyベクター導入細胞に比して、AKT(S473, T308)、rpS6 (S235/S236, S240/S244) の発現亢進がみとめられ、AKT/PIK3-AKT-mTORシグナルが過活性化されていた (図1)。

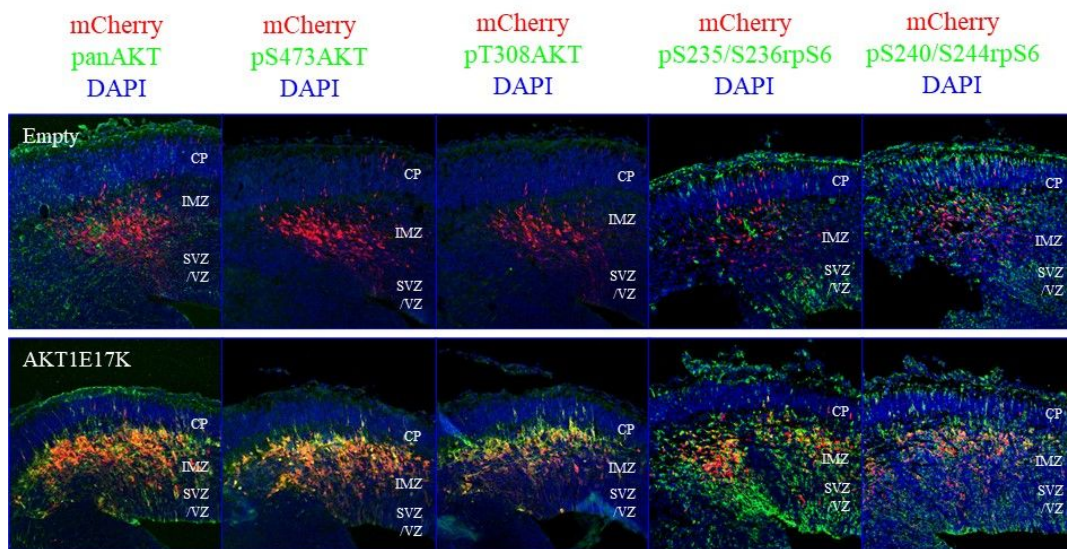


図1. PI3K-AKT-mTORシグナル経路の活性化

変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入細胞では、emptyベクター導入細胞に比して、AKT(S473, T308)、rpS6 (S235/S236, S240/S244)の発現亢進がみとめられた。

- (2) 胎齢13.5日に、変異遺伝子 (*AKT1E17K*) を導入した細胞では、胎齢16.5日、17.5日において、幼弱な神経細胞は中間帯に結節状に残存し皮質板への遊走が抑制され、生後3日においても皮質下ヘテロトピアとして観察された (図2)。

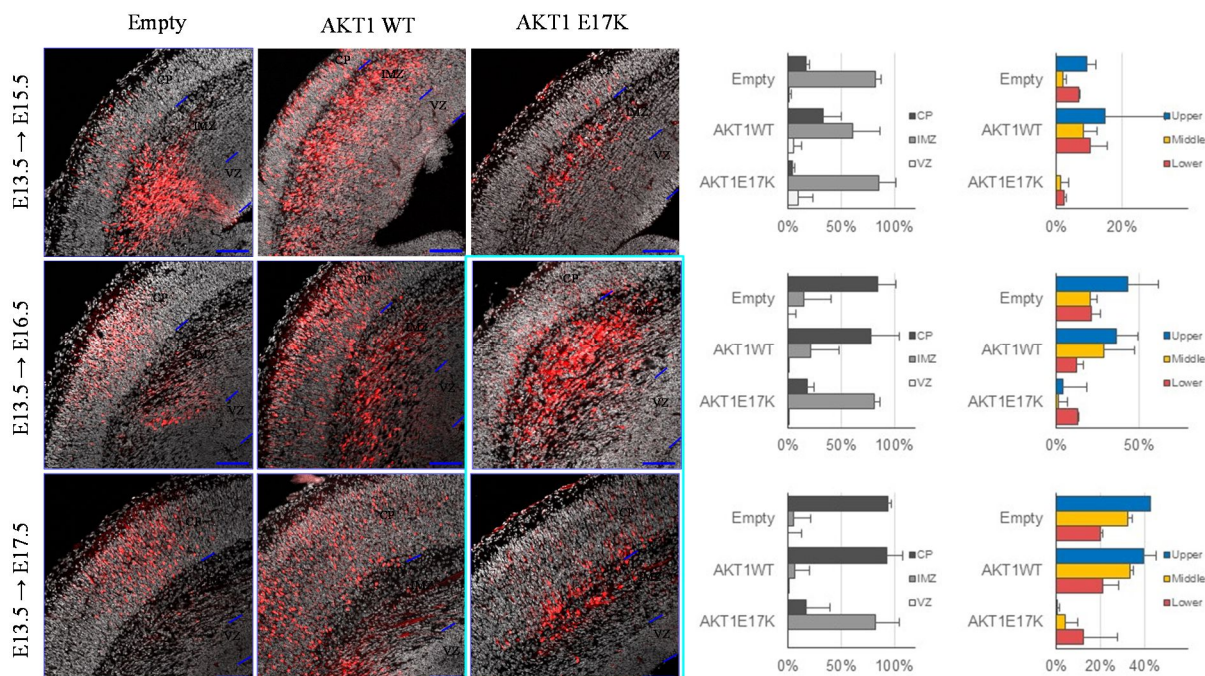


図2. *AKT1E17K*導入細胞における遊走異常

変異遺伝子 (*AKT1E17K*) を導入した細胞では、胎齢16.5日、17.5日において、中間帯に結節状に残存し皮質板への遊走が抑制された。

- (3) 変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入神経細胞では、中間帯において、皮質神経細胞の層マーカとなる複数の転写因子群：Ctip2、Satb2を異所性発現していた (図3)。

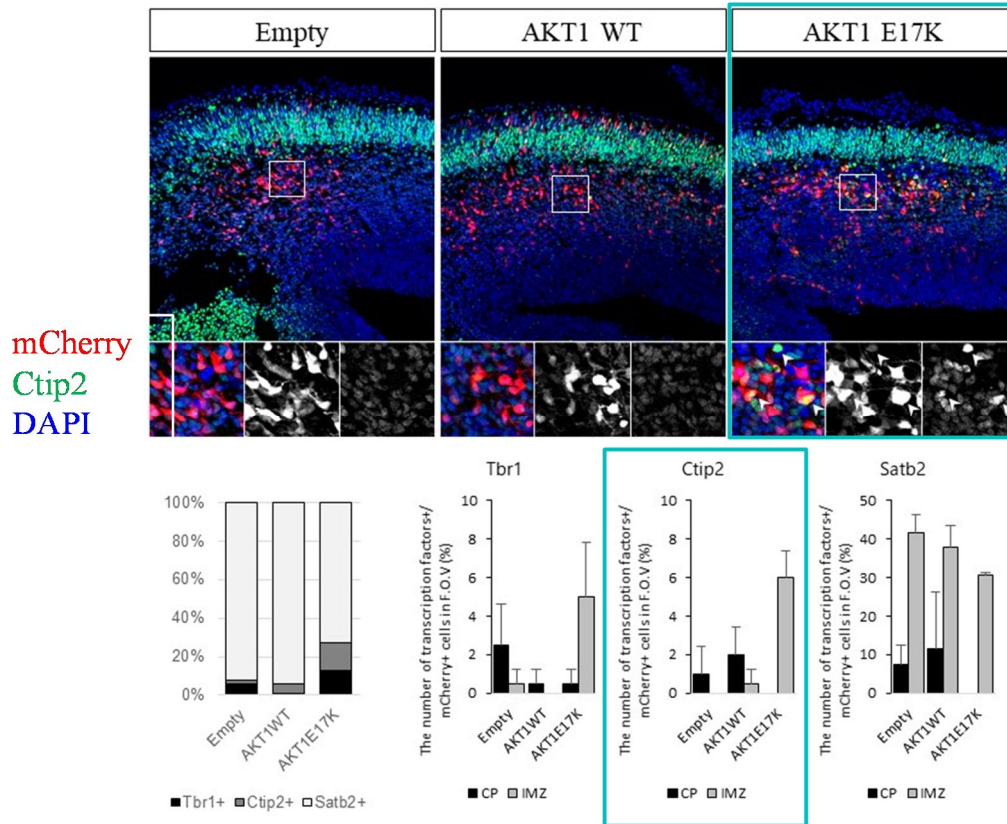


図3. 変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入神経細胞における異所性転写因子発現
中間帯において、皮質神経細胞の層マーカとなる転写因子：Ctip2を異所性に発現する。

- (4) 中間帯で遊走停止した変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入神経細胞は、細胞形態がmultipolarで、胞体サイズが増加していた (図4)。

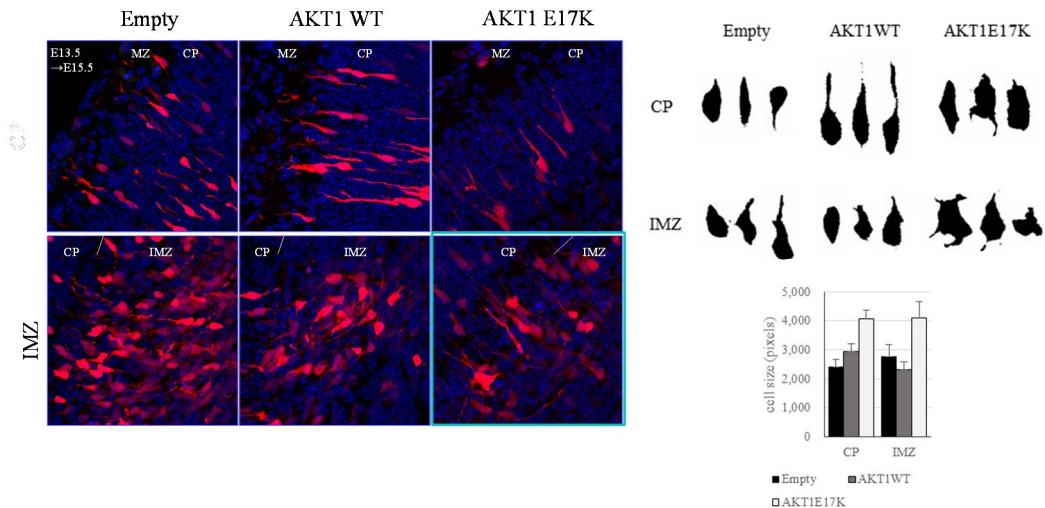


図4. 変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入神経細胞の形態異常
変異遺伝子 (*AKT1E17K*) 導入神経細胞は、multipolarで、胞体サイズが増加していた。

- (5) AKT1 変異体または empty ベクターを導入した遊走ニューロンに対し、空間トランスクリプトーム解析：PIC 法を実施した。エンリッチメント解析（Gene ontology（GO）解析）では、代謝、細胞形態、神経分化などに関する遺伝子と変異型 AKT1 との関連が示唆された。細胞形態制御と関連性が高いアクチン細胞骨格の再構築に対する分子 A の活性化状態について、免疫組織学的解析を実施した結果、AKT1 変異体を発現する細胞において分子 A のリン酸化亢進が観察され、AKT1 変異による遊走異常にはアクチン細胞骨格の再構築を制御するシグナル経路が関係している可能性が示された。
- (6) 動物の *in vivo* モデルでは、ヒトの片側巨脳症の組織形態学的変化が再現され、その分子メカニズムの一環が明らかになった。今後、独自に樹立したヒト神経幹・前駆細胞（NSPCs）を用いた *in vitro* の系で、標的遺伝子のモザイク脳オルガノイドを作製し、個細胞レベルにおける分子発現変動から細胞系譜・分化動態を解明するとともに、胎児期分子標的医療のための創薬スクリーニングを目指した探索的研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoko Itoh, Madoka Tonosaki, Shinji Fushiki
2. 発表標題 Somatic mosaicism of the PI3K-AKT-MTOR pathway causes hemimegalencephaly: analyses of human fetal cases and animal models
3. 学会等名 20th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤本 崇宏 (Fujimoto Takahiro) (10446114)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	伏木 信次 (Fushiki Shinji) (80150572)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------